Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 16, No. 4, Oct- Nov 2020, p. 367-381

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 16، شماره 4، مهر- آبان 1399، ص. 381-367

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی فعالیت ضدقارچی اسانس آویشن نانوکپسوله در برابر *Botrytis cinerea* در انگور قرمز شاهرودی

حدیثه کریمی[1]- حجت اله بداقی[2*]- احمد رجایی[3]- شیده موجرلو[2]

تاریخ دریافت: 1397/08/12
تاریخ پذیرش: 1398/06/23

چکیده

پژوهش حاضر به‌منظور بررسی فعالیت ضدقارچی و پایداری اسانس آویشن درون پوشانی در نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید در برابر قارچ *Botrytis cinerea* در انگور قرمز شاهرودی انجام گرفت. اثر نانوژل کیتوزان-مریستیک اسید در سه سطح صفر، 150 و 300 میکرولیتر در لیتر ، اسانس آویشن خالص و اسانس آویشن درون‌پوشانی شده در نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید در سه سطح 0، 75 و 150 میکرولیتر در لیتر در شرایط آزمایشگاهی و بر ماندگاری میوه‌های انگور در شرایط اتمسفر تعدیل یافته در طی 72 روز نگهداری در دمای 2 تا 4 درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR) اتصال موفقیت‌آمیز بین گروه‌های آمین کیتوزان و گروه‌های کربوکسیلیک اسید- مریستیک اسید را تایید کرد و تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی اندازه ذرات نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید حاوی اسانس را کمتر از 100 نانومتر نشان داد. تست رهایش نشان داد که انتشار اسانس آویشن از نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید روندی دو مرحله‌ای دارد. نتایج حاصل از حبه‌های آلوده بسته‌بندی شده تایید کرد با افزایش غلظت اسانس آویشن، اثر ضدقارچی نیز افزایش یافته است. کمترین میزان هدایت الکتریکی و تغییر رنگ، بالاترین مولفه L^* و شاخص کروما در تیمار اسانس آویشن با غلظت 75 میکرولیتر در لیتر مشاهده گردید. نتایج نشان دادند که غلظت‌های پایین اسانس درون‌پوشانی شده در کنترل عامل *قارچ بوتریتیس* انگور بهتر از اسانس خالص با همان غلظت عمل کرد، در حالی که در آزمایش‌های مربوط به قابلیت انبارمانی میوه انگور تیمار اسانس آویشن با غلظت 75 میکرولیتر در لیتر مطلوبترین نتیجه را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: نانوکپسوله، اثر ضدقارچی، اسانس آویشن، *Botrytis cinerea* ، انگور

مقدمه

انگورهای تازه‌خوری (*Vitis vinifera* L.) در مرحله پس از برداشت و حین انبارداری ضایعات شدیدی را نشان می‌دهد. کاهش کیفیت عمدتا به علت کاهش وزن در اثر از دست دادن آب، نرم شدن بافت، قهوه‌ای شدن چوب خوشه، از دست رفتن عطر و طعم، و رایحه غیرعادی مربوط به رسیدگی بیش از حد که در بیشتر موارد با حضور عظیم حبه‌های آلوده توسط قارچ *Botrytis cinerea* همراه است، ایجاد می‌شود (Carvajal- Milla´n *et al*, 2001; Crisosto *et al*, 2002). کاهش کیفیت انگور در مرحله بعد از برداشت مصرف و تجاری‌سازی آن را محدود می‌کند (Castillo *et al*, 2010). برای کنترل قارچ *Botrytis cinerea* در پس از برداشت انگور از روش‌هایی نظیر استفاده از عوامل کنترل زیستی، ضدمیکروب‌های طبیعی، روش‌های فیزیکی، عوامل ضدعفونی‌کننده GRAS[4] (ازن، اتانول، استیک اسید) استفاده شده است (Romanazzi *et al*, 2012). صابونچی و مسعود (2016)، با بررسی اثر عصاره روغنی آویشن شیرازی بر برخی ویژگی‌های انگور تازه‌خوری رقم سلطانا[5] آلوده شده با قارچ *Botrytis cinerea* بیان کردند، با افزایش غلظت عصاره روغنی فعالیت ضدقارچی در برابر این قارچ افزایش یافته است. مصرف کیتوزان در انگور رقم شاهرودی در مرحله پس از برداشت، ازدست رفتن وزن، فساد میکروبی، قهوه ای شدن، ترک‌خوردگی و ریزش حبه‌ها را کاهش وکیفیت را افزایش داده است (مستوفی، 1390). Romanazzi و همکاران (2007) اثر ترکیبی کیتوزان و اتانول را بر کنترل بیماری کپک خاکستری در پس از برداشت انگور

1 و 2- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیار، گروه علـوم باغبـانی و گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران.
3- استادیار، گروه علوم و صنایع غـذایی، دانشـکده کشـاورزی، دانشـگاه صـنعتی شاهرود، شاهرود، ایران.
(* - نویسنده مسئول: Email: hbodaghi@shahroodut.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v16i4.76390

4Generally recognized as safe
5 Sultana

بررسی کردند. در این آزمایش ترکیبی از غلظت‌های پایین کیتوزان و اتانول باعث بهبود کنترل کپک خاکستری در انگور نسبت به کاربرد هرکدام از آن‌ها به تنهایی گردید.

درون‌پوشانی کردن مواد (یک ماده جامد، مایع یا گاز) به‌منظور حفظ خواص و انتشار کنترل شده ماده موثر انجام می‌گیرد (مهدوی و همکاران، 2014 ;Greay & Hammer, 2015). در برخی از پژوهش‌های گذشته، از کیتوزان به‌عنوان یک عامل درون پوشان‌کننده برای رهایش کنترل‌شده روغن جلبک و رسوراترول، مواد آروماتیک و متانول استفاده شد (2010a و 2010b) Peng *et al*، (2013a) Estevinho *et al* و (2013) Nuisin *et al*، چرا که کیتوزان به‌دلیل ایجاد پیوندهای یونی یا کوالانسی با عوامل پیونددهنده، توانایی تشکیل شبکه سازمان‌دهی شده‌ای را دارد که سبب محافظت ماده فعال می‌شود، از این رو این پیوندهای شیمیایی یک رهایش کنترل شده را در پی خواهند داشت (Estevinho et al., 2013). علاوه بر خواص مطلوب اسانس‌ها در حفظ کیفیت پس از برداشت محصولات وکاهش فساد قارچی، استفاده از اسانس‌ها به دلیل داشتن ترکیبات فرار که به راحتی تحت تاثیر عواملی از قبیل گرما، فشار، نور و اکسیژن تخریب می‌شوند یک محدودیت محسوب می‌شود. همچنین آن‌ها در آب نامحلول و برای کاربردهای مشخص به آزاد شدن تحت شرایط کنترل‌شده نیاز دارند (Martin *et al*, 2010). درون‌پوشانی کردن اسانس‌ها، کارایی آن‌ها را به‌واسطه افزایش دوره اثرگذاری نسبت به اسانس اولیه، افزایش خواهد داد (Silva *et al*, 2010). اخیرا کیتوزان به‌منظور درون‌پوشانی ترکیبات فعال زیستی مورد توجه زیادی قرارگرفته است، چراکه به‌طورکلی ایمن شناخته شده و دارای خواص بیولوژیکی برتر مثل تجزیه‌پذیری، زیست سازگاری وغیرسمی بودن (Keawchaoon &Yoksan, 2011) هستند. محافظت کامل میوه‌های گوجه فرنگی با کاربرد اسانس آویشن درون‌پوشانی شده در نانوژل کیتوزان بنزوئیک اسید در غلظت‌های بالای 700 میلی‌گرم در لیتر طی یک ماه نگهداری صورت گرفت (خلیلی و همکاران، 2015). محمدی و همکاران (2015) نشان دادندکه کاربرد اسانس آویشن شیرازی در پوشش نانوذرات کیتوزان به‌طور قابل توجهی شیوع و شدت بیماری توت فرنگی آلوده به *Botrytis cinerea* را در میوه‌هایی که پس از اعمال تیمار 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 روز در دمای 20 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، کاهش داد. Hsieh و همکاران (2006) نیز گزارش کردند کارایی درون‌پوشانی کردن کیتوران با افزایش غلظت آن، بهبود نمی‌یابد.

بنابراین با توجه به نقصی که در استفاده از اسانس‌های گیاهی رایج به‌عنوان پوشش خوراکی (به‌عنوان مثال، اسانس‌ها به دلیل داشتن ترکیبات فرار و همچنین نامحلول بودن در آب نیازمند آزادشدن تحت شرایط کنترل‌شده هستند) و همچنین محدودیت استفاده از گوگرد و پدهای سولفور به دلیل کارایی آن‌ها در مدت زمان مشخص و محدود، بروز مسمومیت احتمالی و اثرات نامطلوب گاز دی‌اکسید گوگرد بر کیفیت حبه‌های انگور در زمان نگهداری در سردخانه وجود دارد، هدف از این پژوهش درون‌پوشانی کردن اسانس آویشن در نانوژل کیتوزان به‌منظور افزایش و تداوم اثر ضدقارچی آن در برابر *Botrytis cinerea* در شرایط آزمایشگاهی و انبار بر انگور قرمز شاهرودی بود.

مواد و روش‌ها

کیتوزان، مریستیک اسید، استیک اسید، متانول، اتانول، سدیم کلراید، هیدروکسید سدیم، PDA[1] از شرکت مرک آلمان خریداری شد. 1-اتیل-3-(3-دی متیل آمینو پروپیل) کربو دی ایمید (EDC) از شرکت فلوکا آمریکا و توئین 80 از شرکت سامچون کره تهیه گردید. اسانس آویشن از شرکت باریج اسانس خریداری شد. قارچ *Botrytis cinerea* از میوه توت‌فرنگی جداسازی، خالص‌سازی و تست بیماری‌زایی آن انجام شد و این جدایه (BC01) در آزمایشگاه گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود نگهداری شد.

تهیه نانوژل کیتوزان

مریستیک اسید از طریق اتصالات آمیدی و از طریق واکنش‌های واسطه‌ای 1-اتیل-3-(3-دی متیل آمینو پروپیل) کربودی ایمید (EDC) به کیتوزان متصل شد. در ابتدا، 0/5 گرم کیتوزان در 100 میلی لیتر استیک اسید آبی (1% حجمی/ حجمی) حل شد. پس از افزودن 85 میلی‌لیتر اتانول، محلول حاصل تحت امواج فراصوت در محدوده 35 KHz به مدت 5 دقیقه با توان 240 W (Elma Sonic, E30H, Germany) قرار داده شد. سپس 668 میکرولیتر EDC با 250 میلی‌گرم مریستیک اسید حل شده در مقدار مشخصی اتانول مخلوط شد. هر دو محلول به مدت 5 ساعت مخلوط و بهم زده شد. بعد از آن pH با استفاده از هیدروکسید سدیم (1مولار) برای آماده‌سازی نانوژل، توسط دستگاه pHمتر روی 9- 8/5 تنظیم شد. سپس مخلوط برای بهبود یافتن نانوژل آماده شده توسط سانتریفوژ با دور 9000 rpm به مدت 5 دقیقه (Sigma 3-16 KL, Germany) سانتریفوژ شد و در نهایت برای حذف مواد واکنش نداده توسط اتانول و آب مقطر چندین مرتبه شسته شد و توسط فیلتر واتمن با مش 0/2 میکرومتر فیلتر شد (Beyki *et al*, 2014).

خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید

طیف سنجی مادون قرمز

1 Potao Dextro Agar

طیف مادون قرمز نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید با استفاده از اسپکتروفتومتر مادون قرمز 430FT-IR (JASCOW، ژاپن) در دمای 20 درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. دستگاه با محدوده فرکانس 4000-500 cm^{-1} عمل کرد. برای آنالیزمریستیک اسید، کیتوزان و نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید خشک شده، به‌صورت جداگانه با 100 میلی‌گرم KBr مخلوط شد و پس از تهیه قرص توسط دستگاه اندازه‌گیری شد (Beyki *et al*, 2014).

میکروسکوپ الکترونی روبشی

مورفولوژی نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید با اسانس درون‌پوشانی شده با استفاده از دستگاه SEM آنالیز شد. بدین منظور 1 قطره از نمونه‌ها به‌صورت جداگانه بر روی لام ریخته و در دمای محیط خشک شد. در نهایت یک قطره از نمونه پس از خشک شدن در دمای محیط و پوشش‌دهی با طلا برای آنالیز استفاده شد (Beyki *et al*, 2014).

تست رهایش

این پارامتر به‌منظور تعیین میزان آزادشدن اسانس آویشن درون‌پوشانی شده در نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید انجام گرفت. بدین جهت غلظت 5000 میکرولیتر در لیتر از اسانس آویشن و نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید تهیه گردید. سپس این مخلوط به مدت 10 دقیقه در دستگاه اولتراسونیک جهت بارگذاری اسانس در نانوژل قرار گرفت. میزان 2 میلی‌لیتر از این مخلوط در کیسه دیالیز قرار گرفت و دو طرف کیسه بسته شد. در نهایت این کیسه به بطری شیشه‌ای مات که حاوی 450 میلی‌لیتر آب مقطر و اتانول با نسبت یکسان بود منتقل شد. میزان جذب در طول موج 279 نانومتر، در هفته اول به‌صورت روزانه و در هفته‌های دوم تا چهارم به‌صورت یک مرتبه در هفته با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نور مرئی (UV2150، آمریکا) اندازه‌گیری شد. شاهد حاوی اتانول و آب مقطر با نسبت یکسان بود (Beyki et al, 2014).

آزمایش شرایط آزمایشگاهی

در این روش غلظت‌های مشخص از هر تیمار با 15 میلی‌لیتر محیط کشت PDA مخلوط و در پتری دیش های 8 سانتی‌متری به‌منظور به‌دست آوردن غلظت نهایی ریخته شد. غلظت‌های مورد استفاده به‌صورت زیر استفاده شد: برای اسانس آویشن: 37/5، 75، 112/5، 150 و 300 میکرولیتر در لیتر ، نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید: 75، 150، 225، 300، 450، 600 میکرولیتر در لیتر و اسانس آویشن درون‌پوشانی شده در نانوژل کیتوزان-مریستیک اسید: 37/5، 75، 112/5، 150، 300 میکرولیتر در لیتر. بعد از قراردادن میسیلیوم‌های قارچ *Botrytis cinerea* در مرکز محیط کشت، با استفاده از پارافیلم دورگیری و در انکوباتور با دمای 27 درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته قرار داده شد و در روز هفتم که تیمار شاهد به‌طور کامل پر شد میزان رشد میسیلیوم‌های قارچ بر حسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شدند. غلظت‌های بهینه به‌دست آمده با علائم اختصاری در جدول 1 نمایش داده شده‌اند.

جدول 1- علایم اختصاری تیمارها با غلظت‌های بهینه شده

علامت اختصاری	تیمار
Conrtol	شاهد-بدون تیمار
E1	اسانس آویشن 75میکرولیتر در لیتر
E2	اسانس آویشن 150 میکرولیتر در لیتر
N1	نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید 150 میکرولیتر در لیتر
N2	نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید 300میکرولیتر در لیتر
NE1	75 میکرولیتر در لیتر اسانس آویشن درون‌پوشانی شده در نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید
NE2	150 میکرولیتر در لیتر اسانس آویشن درون‌پوشانی شده در نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید

آزمایش آلوده‌سازی حبه‌ها

به‌منظور تایید نتایج شرایط آزمایشگاهی، ارزیابی اثر تیمارهای اسانس و نانوژل اسانس روی حبه‌های انگور آلوده به قارچ بوتریتیس بر اساس روش Mlikota Gabler و همکاران (2001) نیز انجام شد. حبه‌های سالم، یک شکل و یک رنگ جدا شده و در هیپوکلریدسدیم 1/5 درصد به مدت 1 دقیقه قرار داده شده و سپس 3 مرتبه با آب مقطر شست و شو داده شدند. از کشت 5 تا 7 روزه قارچ *Botrytis cinerea* روی محیط PDA سوسپانسیون اسپور تهیه شد و غلظت سوسپانسیون با استفاده از لام هماسیتور $2/5\times10^6$ اسپور در میلی‌لیتر تنظیم شد. بعد از گذشت 45 دقیقه میزان 15 میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی$2/5\times10^6$ اسپور قارچ *Botrytis cinerea* در محل اتصال حبه و خوشه قرار داده شد. سپس حبه‌ها با استفاده از غلظت‌های نهایی تعیین شده در آزمایش شرایط آزمایشگاهی تیمار شده و در فیلم بسته‌بندی پلی‌اتیلن قرار داده شد و سپس فیلم‌ها

دوخت حرارتی شده و در انکوباتور با دمای 20 درجه به مدت 7 روز قرار گرفت. در نهایت شمارش تعداد اسپور برای هر نمونه با سه تکرار انجام گرفت.

ارزیابی ماندگاری میوه‌های تیمار شده در شرایط اتمسفر تعدیل‌یافته

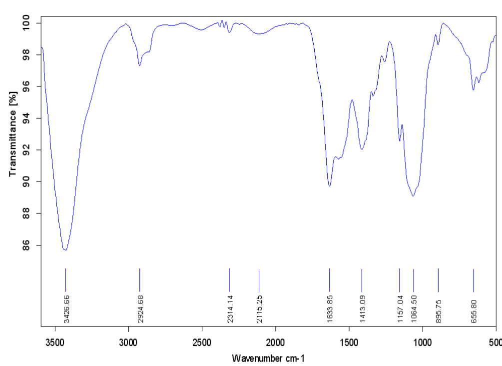
برای انجام این منظور، بعد از انتقال میوه‌ها از باغ به آزمایشگاه، انگورهای سالم از انگورهای آلوده و خراب جدا گردید. سپس به‌منظور حذف آلودگی‌های مزرعه میوه ها 3 مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. پس از خشک شدن، میوه‌ها به چهار گروه جهت اعمال تیمار تقسیم شدند. یک بخش از نمونه‌ها با محلول اسانس 75 و 150 میکرولیتر در لیتر (برای تهیه این غلظت‌ها مقدار 75 و 150 میکرولیتر اسانس به همراه اتانول و توئین80 درصد در یک لیتر آب مقطر حل گردید)، بخش دیگر میوه‌ها با محلول 150 و 300 میکرولیتر در لیتر نانوژل و بخش سوم با محلول 75 و 150میکرولیتر در لیتر اسانس آویشن درون‌پوشانی شده در نانوژل اسپری شدند. قبل از محلول‌پاشی به‌منظور بارگذاری اسانس در نانوژل، مخلوط حاصل به مدت 60 دقیقه در دستگاه اولتراسونیک قرار داده شد. بخش چهارم میوه‌ها به‌عنوان میوه‌های شاهد با استفاده از آب مقطر استریل محلول‌پاشی شدند. پس از خشک شدن میوه‌ها در حدود 250 گرم از میوه‌های انگور در کیسه‌های پلی‌اتیلنی 40 میکرومتر بسته‌بندی شدند و در شرایط دمایی 4- 2 درجه سانتی‌گراد به مدت 72 روز نگهداری قرار گرفتند. در حین دوره نگهداری، ارزیابی صفاتی از قبیل سفتی گوشت میوه توسط پنترومتر دستی، هدایت الکتریکی بافت میوه توسط روش Sayram و همکاران (1997)، برخی از مولفه‌های رنگ پوست میوه براساس روش Muftuoglu و همکاران (2010) با اندکی تغییر، و مواد جامد محلول توسط دستگاه رفرکتومتر (ATAGO master 5EM، ژاپن) انجام گرفت.

نتایج و بحث

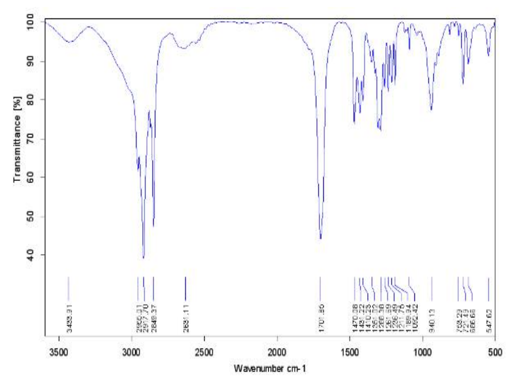
FTIR

مشخصات ساختاری به‌دست آمده برای کیتوزان، مریستیک اسید و نانوژل کیتوزان مریستیک اسید در شکل (1- الف) نشان داده شده است.

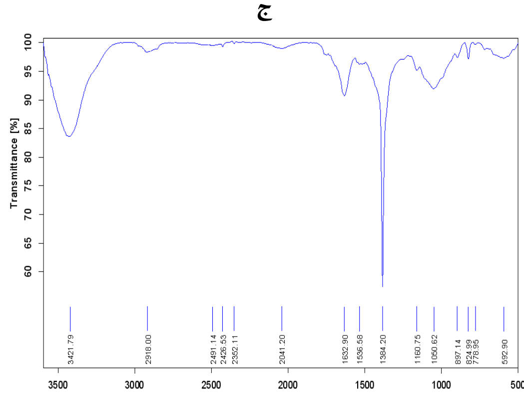
الف



ب:



ج

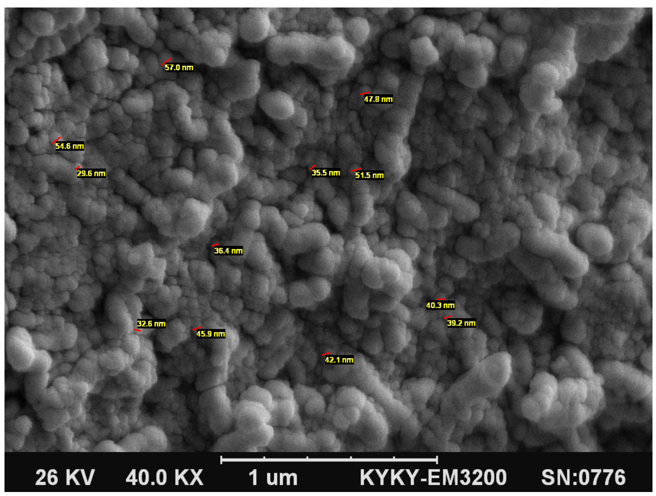


شکل 1- طیف‌های FTIR مربوط به الف: کیتوزان، ب: مریستیک اسید، ج: نانوژل کیتوزان - مریستیک اسید.

طیف کیتوزان جذب در ناحیه $3400-3500\ cm^{-1}$ را نشان می‌دهد که این مربوط به گروه هیدروکسیل کیتوزان است. در $1580 cm^{-1}$ پیک مربوط به ارتعاشات خمشی پیوندهای آمید و آمین و در $2924\ cm^{-1}$ پیک مربوط به ارتعاش کششی C-H گروه‌های متیل و متیلن است. در شکل (1- ب) طیف مربوط به مریستیک اسید نشان داده شده است. پیک‌های شناسایی شده در $2917\ cm^{-1}$ و 2849 مربوط به ارتعاش کششی C-H، پیک $1701 cm^{-1}$ مربوط به ارتعاش کششی C=O، $1470 cm^{-1}$ مربوط به ارتعاش خمشی C-H، $1261\ cm^{-1}$ ارتعاش کششی C-O، $940 cm^{-1}$ مربوط به ارتعاش خمشی O-H، و پیک‌های $721\ cm^{-1}$ و 686 مربوط به ارتعاش خمشی C-H است. در شکل (1- ج) طیف مربوط به نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید نشان داده شده است. با مقایسه طیف‌های مربوط به کیتوزان و نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید می‌توان مشاهده کرد که شدت پیک در ناحیه 1630 (مربوط به گروه C=O) نسبت به 1525 (مربوط به گروه‌های NH_2 آزاد) در نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید در مقایسه با شدت این پیک‌ها در کیتوزان افزایش پیدا کرده است که این می‌تواند به افزایش پیوندهای آمیدی مربوط باشد. تشکیل پیوندهای آمیدی موفق بین کیتوزان و گالیک اسید (Guo *et al*, 2016)، کیتوزان و بنزوئیک اسید (Hadian *et al*, 2017)، کیتوزان و اسیدهای دی‌کربوکسیلیک (Valderruten *et al*, 2014) و کیتوزان و کولاژن (Wang *et al*, 2003) نیز گزارش شده است.

SEM

در شکل 2، تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید حاوی اسانس آویشن نشان داده شده است.

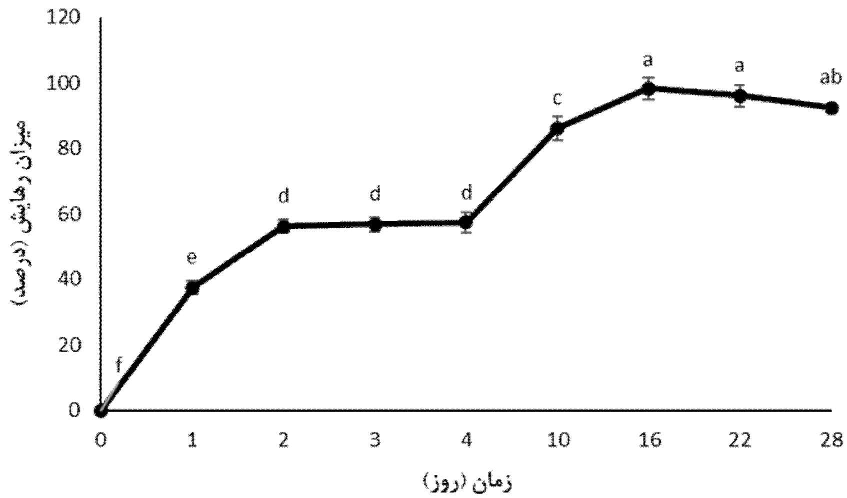


شکل 2- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید حاوی اسانس آویشن.

تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که مورفولوژی نانوژل‌ها تقریباً کروی و اندازه این ذرات کمتر از 100 نانومتر است. اتصال اسیدچرب مریستیک اسید غیرقطبی به پلیمر کیتوزان و قرار گرفتن کمپلکس در یک محیط قطبی باعث تجمع سرهای غیرقطبی به داخل و سرهای قطبی به خارج و تشکیل یک ساختار مجتمع تقریباً کروی شکل گردید. Nasti و همکاران (2009) از پلیمر کیتوزان نانوذراتی در مقیاس 160 و 260 نانومتر با استفاده از اتصالات جانبی تری پلی فسفات ساختند. در پژوهش Lee و همکاران (2012) از پلیمر کیتوزان و گلیکول با استفاده از روش تولید خودبه‌خودی، نانوژلی در ابعاد 200 نانومتر تهیه شد. با مقایسه اندازه ذرات حاصل از این تحقیق با کارهای قبلی (Nasti *et al*, 2009 , Lee *et al*, 2012) اندازه ذرات نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید حاصل در این مطالعه کوچکتر و یکنواخت‌تر بود که این تفاوت می‌تواند به چندین عامل نسبت داده شود؛ اول این که، فراصوت اولیه، زنجیره طولانی کیتوزان را به قطعات کوچک‌تر تبدیل کرد که مانع از شکل‌گیری نانوژل بلند زنجیر شد. عامل دوم می‌تواند به نقش مهم فراصوت مجدد در کاهش اندازه ذرات مربوط باشد و عامل سوم نیز عبور نانوژل از درون فیلتر بود. همچنین در این مطالعه، مریستیک اسید به‌عنوان پیونددهنده برای تشکیل پلیمر کیتوزان (نانوژل) استفاده شد که در مقایسه با سایر پیوند دهنده‌ها مثل گلوتارآلدهید و گلیکول که سمی هستند، ایمن است (Embuscado & Huber, 2009).

تست رهایش

نتایج حاصل از آزادسازی اسانس آویشن از ساختار نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید در دمای محیط (شکل 3) نشان داد، انتشار اسانس آویشن از نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید روندی دو مرحله ای دارد. نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید تهیه شده در این پژوهش دارای نواحی آبدوست (پلیمر کیتوزان) وآبگریز (زنجیره اسیدچرب مریستیک اسید) است که این ساختار موجب شد که ترکیبات اسانس آویشن که ماهیت آبگریز داشتند به‌صورت تدریجی در محیط آزاد شوند. پژوهش حاظر با نتایج مطالعات محمدی و همکاران (2015)، در مورد اسانس آویشن شیرازی درون‌پوشانی شده، مطابقت دارد.



شکل 3- آزادسازی اسانس آویشن درون‌پوشانی شده در نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید به محیط مایع در طی 28 روز نگهداری در دمای محیط.

تعیین غلظت بهینه در شرایط آزمایشگاهی:

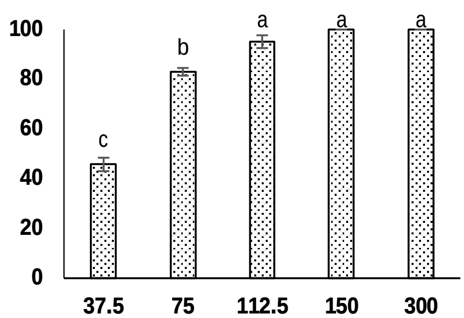
اثر تیمارهای پوششی بر میزان رشد میسیلیوم‌های قارچ *Botrytis cinerea* در شکل 4 نشان داده شده است. با افزایش غلظت اسانس آویشن، فعالیت ضدقارچی نیز افزایش یافت (شکل 4- الف). در این راستا نتایج پژوهش حاضر با نتایج Abdolah و همکاران (2010) در استفاده از اسانس آویشن بر قارچ *Botrytis cinerea* و *Mucor piriformis* و Shin و همکاران (2014) در استفاده از تیمول بر قارچ *Botrytis cinerea* هم‌راستا است. غلظت 600 میکرولیتر در لیتر نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید به‌طور کامل خاصیت قارچ‌کشی نشان داد (شکل 4- ب). محمدی و همکاران (2015) نیز گزارش کردند نانوذره کیتوزان در غلظت 1500 میکرولیتر در لیتر فقط توانست بیشتر از 50% رشد میسیلیوم‌های قارچ *Botrytis cinerea* را کاهش دهد، اما نتوانست به‌طور کامل مانع از رشد آن شود. نتایج حاصل از بررسی شکل 4- ج نشان داد، غلظت‌های 112/5، 150 و 200 میکرولیتر در لیتر اسانس آویشن درون‌پوشانی شده در نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید به‌طور کامل مانع از رشد قارچ شدند. محمدی و همکاران (2015) نیز گزارش کردند از بین چهار غلظت به‌کار گرفته شده اسانس آویشن شیرازی درون‌پوشانی شده در نانوذره کیتوزان، غلظت‌های 1500، 750 و 375 میکرولیتر در لیتر توانستند بیشتر از 50% رشد میسیلیوم‌های قارچ *Botrytis cinerea* را کاهش دهند. تصاویر مربوط به رشد میسلسوم‌های قارچ *Botrytis cinerea* تحت تیمارهای مختلف پوششی در شکل 4- د نشان داده شده است.

نتایج آزمون در انگور قرمز شاهرودی

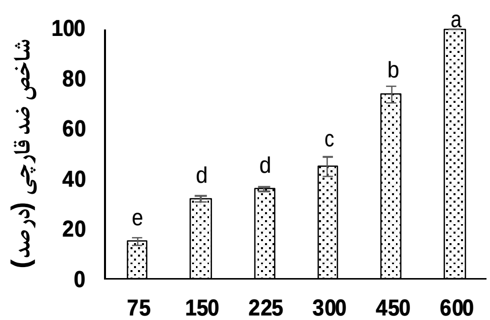
بررسی اثر تیمارهای اسانس و نانوژل- اسانس بر حبه‌های انگور آلوده شده به اسپور *Botrytis cinerea* (شکل 5) نشان داد بیشترین تعداد اسپور در تیمار شاهد ($10/125\times10^5$ در میلی‌لیتر) و کمترین تعداد آن در تیمار NE2 ($1/375\times10^5$ در میلی‌لیتر) مشاهده شد (شکل4). تیمارهای پوششی نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید و اسانس آویشن درون‌پوشانی شده در نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید در غلظت‌های بالاتر موفق‌تر عمل کردند، اما در مورد اسانس، غلظت پایین‌تر تعداد اسپور کمتری را نشان داد. احتمالا افزایش غلظت اسانس باعث تخریب بافت میوه می‌شود. همچنین در تیمار NE2 احتمالا به دلیل درون‌پوشانی شدن اسانس آویشن و آزاد شدن تدریجی آن، تعداد اسپور کمتری مشاهده می‌شود.

اگرچه نمونه‌های موفقی در استفاده از ضدمیکروب‌های طبیعی

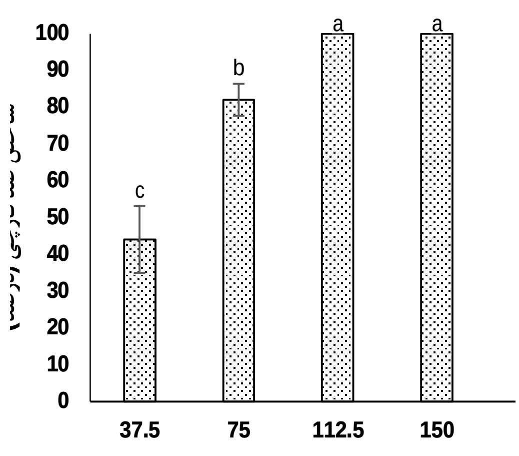
به‌عنوان نگهدارنده مواد غذایی گزارش شده است، ممکن است بعضی از آنها به دلیل انتشار سریع در بخش عمده مواد غذایی، اثرات ناکارآمد داشته و یا با اجزای مواد غذایی اثر متقابل نشان دهند که ممکن است باعث کاهش فعالیت ضدمیکروبی آنها در برابر سلول هدف شود (Perricone *et al*, 2015). Munoz و Moret (2010) اثر ضدقارچی پوشش کیتوزان را روی انگور زمانی مشاهده کردند، که غلظت کیتوزان در محلول حداقل 0/25 درصد بود. Lopez-Reyes و همکاران (2010) نیز بیان کردند، اسانس پونه کوهی، مرزه و آویشن اثرات معنی‌داری را در برابر پاتوژن‌های *B.cinerea* و *Penicillium expansum* نشان دادند. غفوری و همکاران (1394) نیز با محلول‌پاشی پس از برداشت اسانس آویشن بر عمر انبارمانی میوه انار بیان کردند، هر سه سطح تیمار آویشن به‌کار گرفته شده (500، 1000، 1500 میلی‌گرم در لیتر) تاثیر یکسانی بر کنترل پوسیدگی داشتند. همچنین بیان کردند کاربرد اسانس آویشن روی انارهای آلوده شده به اسپور قارچ، به‌طور موثری پوسیدگی را کاهش داد. Mohammadi و همکاران (2015) نیز با کاربرد نانوذره کیتوزان و اسانس آویشن شیرازی نانوکپسوله شده در نانوذره کیتوزان بر توت فرنگی‌های غوطه ور شده در سوسپانسیون *Botrytis cinerea* پس از 9 روز نگهداری، بیان کردند در غلظت 1500 میکرولیتر در لیتر، پایین‌ترین درصد آلودگی توت فرنگی‌ها، برای اسانس نانوکپسوله شده در نانو ذره کیتوزان (16/67 درصد) و بعد از آن برای نانو ذره کیتوزان (66/67 درصد) مشاهده شد. این در حالی است که میوه‌های تیمار نشده آلودگی 100 درصد نشان دادند.



الف-غلظت اسانس آویشن (میکرولیتر/لیتر)



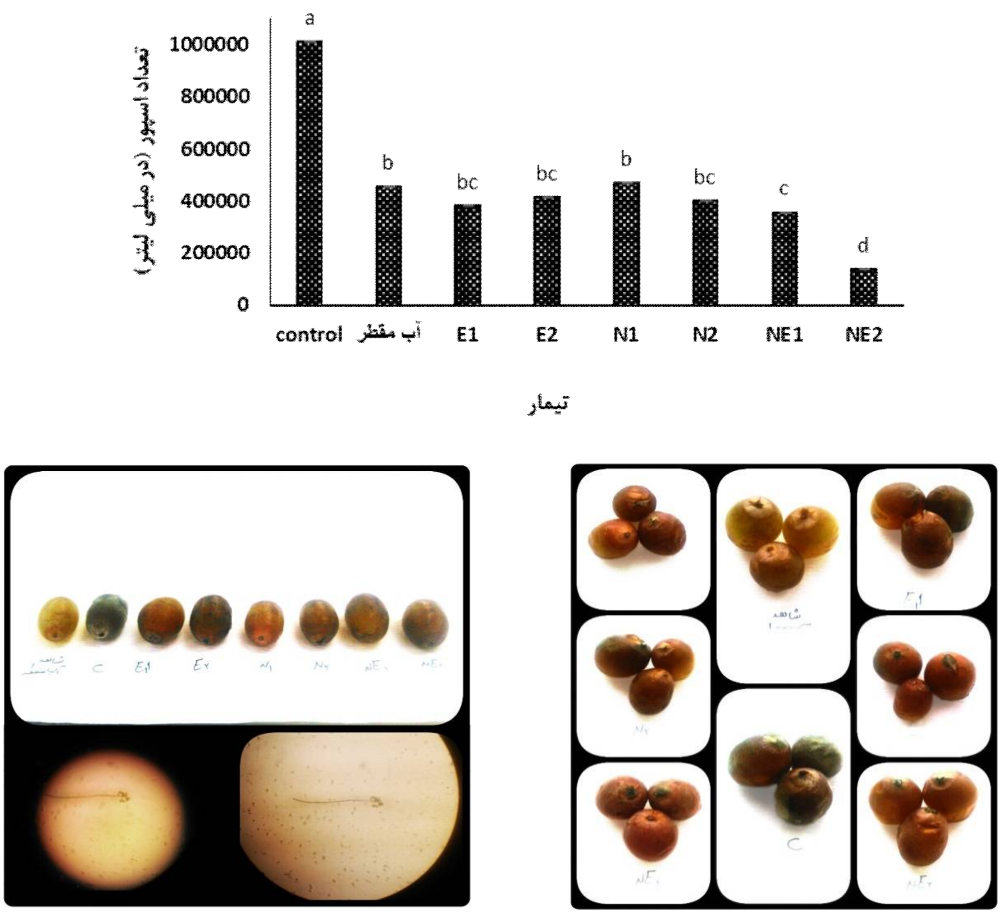
ب-نانوژل کیتوزان-مریستیک اسید (میکرولیتر در لیتر)





د-بالاچپ: شاهد، بالا راست: اسانس آویشن باغلظت 75 مایکرولیتردرلیتر، پایین چپ: نانوژل کیتوزان-مریستیک اسید، پایین راست: نانوژل و اسانس با غلظت 75 مایکرولیتردرلیتر

شکل 4- اثر اسانس آویشن، نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید و اسانس آویشن درون‌پوشانی شده در نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید بر رشد قارچ *Botrytis cinerea*.



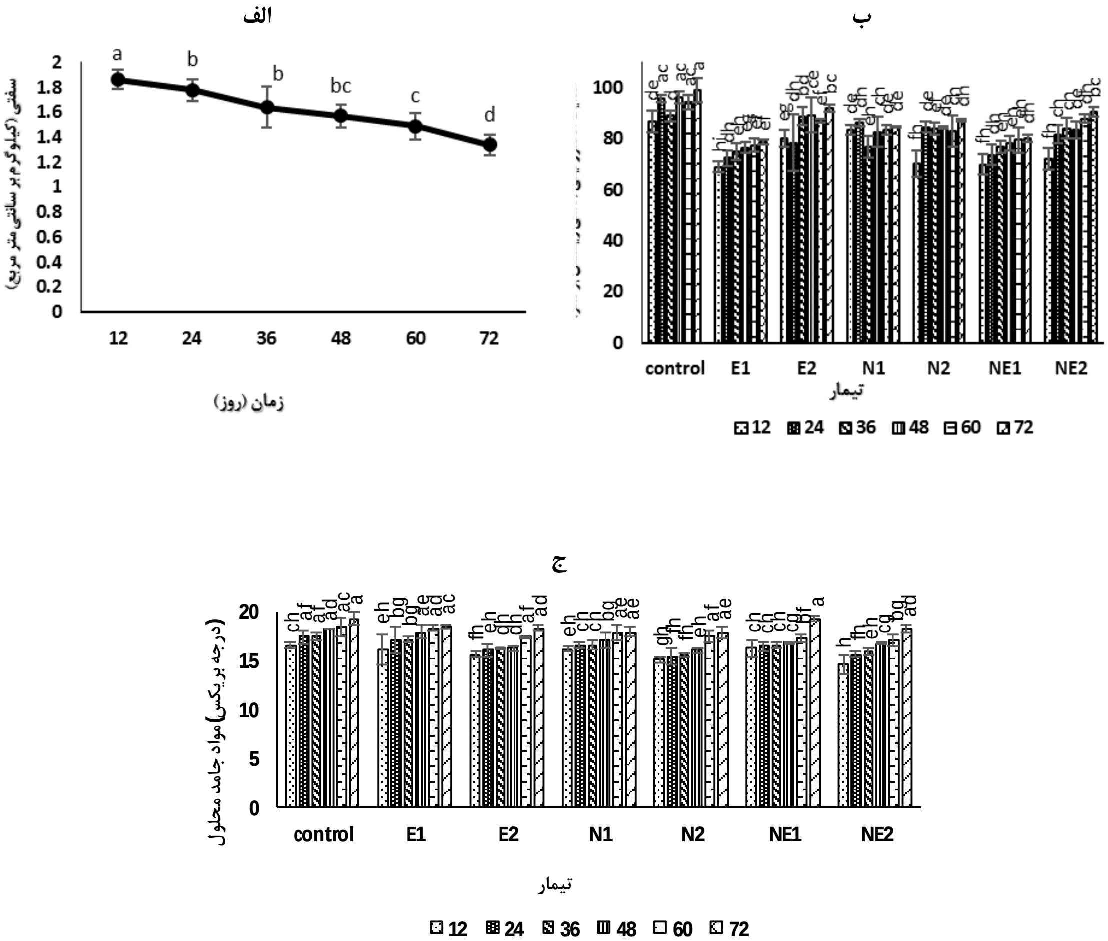
شکل 5-اثر تیمارهای پوششی بر تعداد اسپور قارچ *Botrytis cinerea* در شرایط این ویوو.
(E1: اسانس آویشن 75میکرولیتر در لیتر، E2: اسانس آویشن 150 میکرولیتر در لیتر، N1: نانوژل کیتوزان - مریستیک‌اسید 150 میکرولیتردر لیتر، N2: نانوژل کیتوزان - مریستیک‌اسید 300میکرولیتر در لیتر، NE1: 75 میکرولیتر در لیتر اسانس آویشن درون‌پوشانی شده در نانوژل کیتوزان - مریستیک‌اسید، NE2: 150 میکرولیتر در لیتر اسانس آویشن درون‌پوشانی شده در نانوژل کیتوزان - مریستیک‌اسید) شکل سمت چپ، پائین: اسپور *Botrytis cinerea*.

سفتی بافت میوه

همانطور که در شکل 6- الف مشاهده می‌گردد، سفتی گوشت میوه با گذشت زمان روند کاهشی داشته است به‌طوری که میزان آن از 1/86 (کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع) در ابتدای زمان نگهداری، به 1/34 (کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع) در انتهای دوره رسید. بین تیمارهای مختلف پوشش خوراکی تفاوت معنی‌داری از نظر سفتی بافت میوه مشاهده نشد. نتایج به‌دست آمده با نتایج مستوفی و همکاران (1390) که بیان کردند با گذشت زمان میزان سفتی حبه‌ها در انگور سرخ فخری شاهرودی به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است، مطابقت داشت. همچنین Brummell و Harpster (2002) در یک بررسی گزارش کردند کاهش سفتی میوه انگور طی انبارمانی با کاهش همی‌سلولز، سلولز و پکتین همراه شده است و این تغییرات که مشخص‌کننده نرم شدن میوه است نتیجه افزایش دپلی‌مریزه شدن و تجزیه پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی است. همچنین نتایج حاصل از بررسی جدول تجزیه واریانس نشان داد، که میزان سفتی نمونه‌ها تحت اثر تیمارهای پوششی و همچنین اثر متقابل تیمارهای پوششی× زمان قرار نگرفت (داده‌ها نشان داده نشده است). علت عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف پوشش خوراکی می‌تواند به دلیل ایجاد اتمسفر تعدیل‌یافته توسط فیلم بسته‌بندی و ممانعت از تبخیر و کاهش فرایند تنفس میوه‌های بسته‌بندی شده شاهد و تیمار شده باشد به‌نحوی که پوشش های خوراکی اثر افزایشی در حفظ سفتی بافت میوه نشان ندادند.

با توجه به شکل 6- ب، میزان هدایت الکترولیتی در طی زمان روندی افزایشی داشته است. در انتهای دوره نگهداری بیشترین میزان

هدایت الکترولیتی مربوط به تیمار شاهد و کمترین میزان آن هم مربوط به تیمار E1 بود.

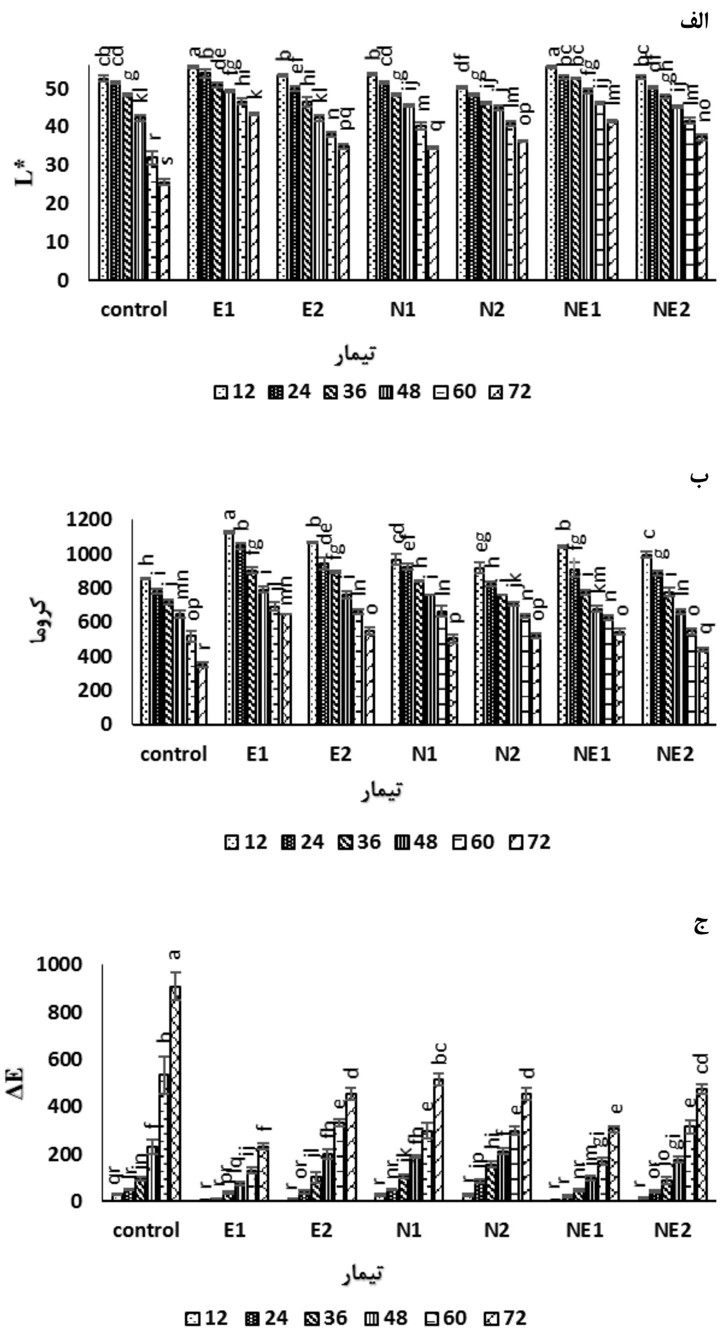


شکل 6- اثر متقابل تیمارهای پوششی× زمان بر سفتی، هدایت الکترولیت و میزان مواد جامد محلول کل.

در پژوهشی Mohammadrezakhani و Pakkish (2015) با کاربرد پرولین و آسکوربیک اسید بر کاهش شاخص سرمازدگی و پروکسید هیدروژن بر انگور رقم تامسون در طی انبارمانی بیان کردند، در تمامی تیمارهای بکار گرفته شده و همچنین تیمار شاهد، نشت الکترولیت روندی افزایشی داشته است. همچنین شاخص سرمازدگی و نشت الکترولیت در میوه‌های تیمار شده با پرولین و آسکوربیک اسید به‌طور قابل توجهی نسبت به میوه‌های شاهد پایین‌تر بود. غفوری و همکاران (1394) با کاربرد اسانس آویشن در پس از برداشت میوه انار بیان کردند، اسانس آویشن نشت یونی را کاهش داده و با افزایش مدت انبارمانی نشت یونی افزایش یافت. همچنین تاثیر مثبت اسانس آویشن در کاهش خسارت سرمازدگی و نشت یونی درمدت انبارمانی را بیان کردند. سرما در بافت‌های گیاهی باعث کاهش سیالیت غشای سلولی و بروز سرمازدگی در غشاء سلولی آسیب دیده می‌شود که منجر به افزایش نشت یونی از غشاء سلول می‌شود. به‌نظر می‌رسد اسانس آویشن در دمای پایین با تاثیر در حفظ سیالیت ساختار غشای پلاسمایی و اندامک داخلی از جمله تونوپلاست مانع از هم پاشیدن آنها و در نتیجه باعث کنترل نشت یون‌ها و مواد موجود در واکوئول به سیتوزول و فضاهای سیتوپلاسمی شده است.

میزان مواد جامد محلول در طی زمان روندی افزایشی نشان داد (شکل 6- ج). در ابتدای نگهداری، کمترین میزان مواد جامد محلول، در تیمار NE2 (14/66 درجه بریکس) مشاهده گردید که البته با تیمار N2 (15/16 درجه بریکس) تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. در این زمان بیشترین میزان این صفت، در تیمار شاهد مشاهده گردید که البته تفاوت معنی‌داری با تیمارهای E1 (16/16 درجه بریکس) و NE1 (16/33 درجه بریکس) نداشت. در انتهای نگهداری نیز بیشترین میزان مواد جامد محلول برای تیمار شاهد (19/33 درجه

بریکس) ثبت گردید که تفاوت معنی‌داری با تیمار NE1 (19/31 درجه بریکس) نشان نداد.



شکل7- اثر متقابل تیمارهای پوششی× زمان بر مولفه‌های رنگی.

با توجه به نتایج بالا بیشترین میزان مواد جامد محلول در شاهد وجود دارد، اگرچه تیمارها به لحاظ مواد جامد محلول، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند، اما به لحاظ عددی بیشترین مواد جامد محلول در نمونه‌های شاهد دیده شد که با نتایج این محققان مطابق است. Topalovic و Milukovic (2010) نیز گزارش کردند که افزایش میزان مواد جامد محلول در مرحله رسیدن

انگور نتیجه کاهش آب میوه، تجزیه قندهای مرکب و تبدیل آنها به قندهای ساده و هضم سلولی است. به‌نظر می‌رسد با توجه به نافرازگرا بودن و عدم وجود ذخایر نشاسته در میوه انگور و این که از دست‌دهی رطوبت منجر به تجمع قندها می‌شود استفاده از فیلم بسته‌بندی و ایجاد شرایط اتمسفر تعدیل‌یافته از تبخیر آب در میوه‌های شاهد و تیمار شده ممانعت کرده است و اثر افزایشی پوشش‌های خوراکی توام با فیلم بسته‌بندی در کاهش تبخیر آب از بافت میوه، به لحاظ آماری معنی‌دار نشده است.

رنگ‌سنجی

مشاهده شکل 7- الف نشان می‌دهد با گذشت زمان تیرگی میوه‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. این افزایش در نمونه‌های شاهد بیشتر از سایر تیمارها بوده است. Supapvanich و Tucker (2011) گزارش کردند که کاهش شاخص L* در انتهای نمونه‌برداری به دلیل توسعه شیشه‌ای شدن در سطح میوه می‌باشد. کاهش L* به از دست‌دهی آب بافت انگور مربوط است. با این‌حال به نظر می‌رسد که کاهش در L* در این آزمایش رابطه تنگاتنگی با افزایش میزان قهوه‌ای شدن حبه‌ها داشته است. به نظر می‌رسد افزایش تجمع ترکیبات رنگی ملانین که باعث قهوه‌ای شدن بافت‌ها می‌شود موجب افزایش تیرگی رنگ حبه‌ها شده است (Artes-Hernandez & Aguayo, 2004).

با توجه به شکل 7- ب، شاخص کروما در تمامی تیمارها در طی زمان کاهش یافته است که این کاهش در شاهد بیشتر از سایر تیمارهاست. همچنین تمامی تیمارها میزان کرومای بیشتری را نسبت به شاهد نشان دادند. رحیمی و همکاران (1393) نیز به تاخیر افتادن تغییر در شاخص‌های درخشندگی L*، کروما و هیو انگل را در میوه‌های انگور تیمار شده با پوترسین گزارش کردند.

با توجه به شکل 7- ج، در تمامی تیمارها، تغییرات رنگ کلی در طی زمان افزایش یافته است و این افزایش در شاهد بیشتر از سایر تیمارها است (910/33 به 31/16). در مورد اختلاف رنگ کل از هر سه مولفه رنگ (L,a,b) استفاده شده است که می‌تواند شاخص مناسب‌تری برای نشان دادن تغییرات رنگ باشد (Nopwinyuwong *et al*, 2010). همچنین گزارش شده است که تاخیر در پیری در اثر کاربرد اسانس‌ها، به‌واسطه کاهش تغییرپذیری رنگ میوه و کاهش شاخص تیرگی است (Valero *et al*, 2006).

نتیجه‌گیری

در این پژوهش اسانس آویشن درون‌پوشانی شده در نانوژل کیتوزان- مریستیک اسید تهیه شد. سپس ویژگی‌های مورفولوژیکی و ساختاری نانوژل کیتوزان حاوی اسانس آویشن ارزیابی شد. تصاویر SEM و ارزیابی آزمایش‌های FTIR ساختار نانویی و اتصالات موفق پیوندی مورد انتظار را تایید کردند. از طرف دیگر آزمون‌های رهایش، *این ویترو* و *این ویوو* محصول سنتز شده قابلیت رهایش اسانس از نانوژل کیتوزان و خاصیت ضدقارچی آن را تایید کردند. بررسی اثر نانوژل اسانس و اسانس به تنهایی بر ماندگاری پس از برداشت انگورهای بسته‌بندی شده با فیلم پلی‌اتیلنی، کارایی بهتر اسانس به تنهایی را نسبت به نانوژل اسانس تایید کرد. کارایی کمتر نانوژل اسانس نسبت به اسانس می‌تواند به دلیل ممانعت از انتشار اسانس به‌واسطه فیلم بسته‌بندی باشد. در صورتی که اسانس محبوس شده در کپسول کیتوزان به علت رهایش کندتر نسبت به اسانس به تنهایی، احتمالا اثر خود را در مدت زمان بیشتری از آنچه در این پژوهش برای دوره نگهداری انگور در نظر گرفته شده نشان بدهد. با توجه به این مورد و قابلیت ضدمیکروبی نانوژل اسانس، بررسی اثر نانوژل اسانس در مقایسه با اسانس بر ماندگاری انگور برای مدت طولانی‌تر ضروری به‌نظر می‌رسد

منابع

رحیمی، س.، میردهقان، ح.، اسماعیلی‌زاده، م. 1393. تأثیر تیمار پوتریسین به روش غوطه وری تحت فشار بر کیفیت پس از برداشت دو رقم انگور. نشریه علوم باغبانی ایران، جلد 45، شماره 2، 149 – 137.

غفوری، م.، سلیمانی، ع.، ربیعی، و.، همتی، ر. 1394. تاثیر محلول‌پاشی پس از برداشت اسانس آویشن بر عمر انبارمانی و کیفیت میوه انار (رقم پوست قرمز طارم). نشریه علوم باغبانی، جلد 29، شماره 4، 555-547.

مستوفی، ی.، دهستانی، م.، رضوی، ه. 1390. اثر کیتوزان بر افزایش عمر پس از برداشت و ویژگی‌های کیفی انگور رقم شاهرودی. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، شماره 8، جلد 30، 102-93.

Abdolahi, A., Hassani, A., Ghuosta, Y., Bernousi, I. & Meshkatalsadat, M.H., 2010, In vitro efficacy of four plant essential oils against *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. and Mucor piriformis A. Fischer. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13(1), 97-107.

Artes-Hernandez, F., Aguayo, E. & Artes, F., 2004, Alternative atmosphere treatments for keeping quality of 'autumn seedless' table grapes during long-term cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 31(1), 59-67.

Beyki, M., Zhaveh, S., Khalili, S. T., Rahmani-Cherati, T., Abdollahi, A., Bayat, M., Tabatabaei, M. & Mohsenifar, A.,

2014, Encapsulation of *Mentha piperita* essential oil in chitosan-cinamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus. Industrial Crops products*, 54, 310-319.

Brummell, D.A. & Harpster, M.H., 2001, Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant molecular biology*, 47(1-2), 311-339.

Carvajal-Millan, E., Carvallo, T., Orozco, J.A., Martınez, M.A., Tapia, I., Guerrero, V.M., Chu, A.R., Llamas, J. & Gardea, A.A., 2001, Polyphenol oxidase activity, color changes, and dehydration in table grape rachis during development and storage as affected by N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea. *Jornal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 946-951.

Castillo, S., Navarro, D., Zapata, P.J., Guillen, F., Valero, D., Serrano, M. & Martinez-Romero, D., 2010, Antifungal efficacy of Aloevera in vitro and its use as a preharvest treatment to maintain postharvest table grape quality. *Postharvest Biology and technology*, 57(3), 183-188.

Chauhan, S., Gupta, K.C. & Agrawal, M., 2014, Application of Biodegradable Aloe vera gel to control post harvest decay and longer the shelf life of Grapes. *International Journal of Current Microbiology Applied Science*, 3(3), 632-642.

Crisosto, C.H., Garner, D. & Crisosto, G., 2002, Carbon dioxide-enriched atmospheres during cold storage limit losses from Botrytis but accelerate rachis browning of ‘Redglobe’ table grapes. *PostharVest Biology and Technology,* 26, 181-189.

Embuscado, M.E. & Huber, K.C., 2009, Edible films and coatings for food applications. New York, NY, USA: *springer*. pp. 213-214.

Estevinho, B.M.A.N., Rocha, F.A.N., Santos, L.M.D.S. & Alves, M.A.C., 2013a, Using water-soluble chitosan for flavour microencapsulation in food industry. *Journal of microencapsulation*, 30(6), 571-579.

Estevinho, B.N., Rocha, F., Santos, L. & Alves, A., 2013b, Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications–A review. *Trends in Food Science and Technology*, 31(2), 138-155.

Greay, S.J. & Hammer, K.A., 2015, Recent developments in the bioactivity of mono-and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. *Phytochemistry reviews*, 14(1), 1-6.

Guo, P., Anderson, J.D., Bozell, J.J. & Zivanovic, S., 2016, The effect of solvent composition on grafting gallic acid onto chitosan via carbodiimide. *Carbohydrate polymers*, 140, 171-180.

Hadian, M., Rajaei, A., Mohsenifar, A. & Tabatabaei, M., 2017, Encapsulation of Rosmarinus officinalis essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antibacterial activity in beef cutlet against *Salmonella typhimurium* during refrigerated storage. *LWT-Food Science and Technology*, 84, 394-401.

Hsieh, W.C., Chang, C.P. & Gao, Y.L., 2006, Controlled release properties of chitosan encapsulated volatile citronella oil microcapsules by thermal treatments. Colloids and Surfaces B: *Biointerfaces*, 53(2), 209-214.

Keawchaoon, L. & Yoksan, R., 2011, Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. Colloids and surfaces B: *Biointerfaces*, 84(1), 163-171.

Khalili, S.T., Mohsenifar, A., Beyki, M., Zhaveh, S., Rahmani-Cherati, T., Abdollahi, A. & Tabatabaei, M., 2015, Encapsulation of Thyme essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *LWT-Food Science and Technology*, 60(1), 502-508.

Lee, J., Lee, C., Kim, T.H., Lee, E.S., Shin, B.S., Chi, S.C., Park, E.S., Lee, K.C. & Youn, Y.S., 2012, Self-assembled glycol chitosan nanogels containing palmityl-acylated exendin-4 peptide as a long-acting anti-diabetic inhalation system. *Journal of controlled release* 161(3), 728-734.

Lopez-Reyes, JG., Spadaro, D., Gullinoa, Ml. & Garibaldia, A., 2010, Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rot caused by fungi on four cultivars of apples in vivo. *Flavour Fragr Journal*, *25*, 171-177.

Mahdavi, S.A., Jafari, S.M., Ghorbani, M. & Assadpoor, E., 2014, Spray-drying microencapsulation of anthocyanins by natural biopolymers: A review. *Drying technology*, 32(5), 509-518.

Martin, A., Varona, S., Navarrete, A. & Cocero, M.J., 2010, Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: applications with essential oils. *Open Chemical Engineering Journal*, 4(1), 31-41.

Mlikota Gabler, F. & Smilanick, J.L., 2001, Postharvest control of table grape gray mold on detached berries with carbonate and bicarbonate salts and disinfectants. American Journal of Enology and Viticulture, 52(1), 12-20.

Mohammadi, A., Hashemi, M. & Hosseini, S.M., 2015, Nanoencapsulation of *Zataria multiflora* essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mould disease. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 28, 73-80.

Mohammadrezakhani, S. & Pakkish, Z., 2015, Reduction of chilling injury and peroxide hydrogen accumulation in Thompson grape (*Vitis vinifera* L.) fruit by proline and ascorbic acid during storage. *Journal of Plant Physiology & Breeding*, 5(1), 1-12.

Muftuoglu, F., Ayhan, Z. & Esturk, O., 2010, Modified atmosphere packaging of kabaasi apricot (*Prunus armeniaca*

L.Kabaasi): Effect of atmosphere, packaging material type and coating on the physicochemical properties and sensory quality. *Food and Bioprocess Tecnology*, 12.

Munoz, Z. & Moret, A., 2010, Sensitivity of *Botrytis cinerea* to chitosan and acibenzolar-S-methyl. Pest management science, 66(9), 974-979.

Nasti, A., Zaki, N.M., de Leonardis, P., Ungphaiboon, S., Sansongsak, P., Rimoli, M. G. & Tirelli, N., 2009, Chitosan/TPP and chitosan/TPP-hyaluronic acid nanoparticles: systematic optimisation of the preparative process and preliminary biological evaluation. *Pharmaceutical research*, 26(8), 1918-1930.

Nopwinyuwong, A., Trevanich, S. & Suppakul, P., 2010, Development of a novel colorimetric indicator label for monitoring freshness of intermediate-moisture dessert spoilage. Talanta, 81(3), 1126-1132.

Nuisin, R., Krongsin, J., Noppakundilograt, S. & Kiatkamjornwong, S., 2013, Microencapsulation of menthol by crosslinked chitosan via porous glass membrane emulsification technique and their controlled release properties. *Journal of microencapsulation*, 30(5), 498-509.

Peng, H., Xiong, H., Li, J., Chen, L. & Zhao, Q., 2010a, Methoxy poly (ethylene glycol) -grafted-chitosan based microcapsules: Synthesis, characterization and properties as a potential hydrophilic wall material for stabilization and controlled release of algal oil. *Journal of Food Engineering*, 101, 113-119.

Peng, H., Xiong, H., Li, J., Xie, M., Liu, Y., Bai, C. & Chen, L., 2010b, Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol. *Food Chemistry*, 121(1), 23-28.

Perrico, M., Arace, E., Corbe, M.R., Sinigagila, M. & Bevilacqua, A., 2015, Bioactivity of essential oils. A review on their interaction with food components. Frontiers in Microbiology, 1-7.

Romanazzi, G., Karabulut, O.A. & Smilanick, J.L., 2007, Combination of chitosan and ethanol to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest biology and technology*, 45(1), 134-140.

Romanazzi, G., Lichter, A., Gabler, F.M. & Smilanick, J.L., 2012, Recent advances on the use of natural and safe alternatives to conventional methods to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 63(1), 141-147.

Sabounchi, S. & Massoud, R., 2016, The effects of *Zataria multiflora* essential oil on some characteristics of sultana table grapes contaminated with *Botrytis cinerea*. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 6(1), 49-54.

Shin, M.H., Kim, J.H., Choi, H.W., Keum, Y.S. & Chun, S.C., 2014, Effect of thymol and linalool fumigation on postharvest diseases of table grapes. *Mycobiology*, 42(3), 262-268.

Silva, P.S., Viccini, L.F., Singulani, J.L., de Siqueira, E.P., Zani, C.L. & Alves, T.M.A., 2010, Chemical composition of the essential oil and hexanic fraction of Lippia and Lantana species. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 20(6), 843-849.

Supapvanich, S. & Tucker, G.A., 2011, Physicochemical changes in fresh-cut Honeydew melon fruit during storage. *African Journal of Agricultural Research*, 6(12), 2737-2742.

Topalovic, A. & Milukovic-Petkovsek, M., 2010, Changes in sugars, organic acids and phenolics of grape berries of cultivar Cardinal during ripening. *Journal Food Agriculture Environ*, 8(3&4), 223-7.

Valderruten, N.E., Valverde, J.D., Zuluaga, F. & Ruiz-Durántez, E., 2014, Synthesis and characterization of chitosan hydrogels cross-linked with dicarboxylic acids. Reactive and Functional Polymers, 84, 21-28.

Valero, D., Valverde, J.M., MartInez-Romero, D., Guillen, F., Castillo, S. & Serrano, M., 2006, The combination of modified atmosphere packaging with eugenol or thymol to maintain quality, safety and functional properties of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 41(3), 317-327.

Wang, X.H., Li, D.P., Wang, W.J., Feng, Q.L., Cui, F.Z., Xu, Y.X. & van der Werf, M., 2003, Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers. *Biomaterials*, 24(19), 3213-3220.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 16, No. 4, Oct- Nov 2020, p. 367-381

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 16، شماره 4، مهر - آبان 1399، ص. 381-367

Investigation of antifungal activity of nanoencapsulation of *Thyme vulgaris* essential oil against botrytis cinerea in red shahroodi grape (*Vitis vinifera* CV. Red)

H. Karimi[1]- H. Bodaghi[2*], A. Rajaei[3], Sh. Mojerlou[2]

Received: 2018.11.03
Accepted: 2019.09.14

Introduction: Fresh grapes (Vitis vinifera L.) show severe lesions at the post-harvest stage and during the storage period. Decreasing the quality of grapes in the post-harvest stage limits its consumption and commercialization. Some methods such as using bio-control agents, natural antimicrobials, physical methods, disinfectants agents ,GRAS, (ozone, ethanol, acetic acid) have been used to control *Botrytis cinerea* after harvest. Encapsulation of the essential oils will increase their ability by increasing the effectiveness of the essential oils. Currently, chitosan has been interested for encapsulating bioactive compounds, as they are generally known to be safe and possess superior biological properties such as biodegradability, biocompatibility and non-toxicity. The aim of this study was to encapsulate thyme essential oil in chitosan nanogels to enhance and maintain its antifungal effect against *B. cinerea* in vitro and in vitro on Shahroodi red grape.

Materials and methods: For the purpose of this study, chitosan nanogels were first prepared and the infrared spectrum of chitosan-meric acid nanogels was measured using FT-IR430 infrared spectrophotometer at 20 ° C. The morphology of chitosan-meric acid nanogels and encapsulated essential oil was analyzed by SEM. Release test was then performed to determine the release rate of thyme essential oil encapsulated in chitosan-meric acid nanogels. Effect of chitosan-meristic acid nanogels at three levels of 0, 150 and 300 µl/L, pure thyme essential oil and thyme essential oil encapsulated in chitosan-meristic acid nanogels at three levels of 0, 75 and 150 µl / L in vitro and on the shelf life of grape fruits was studied under modified atmospheric conditions during 72 days storage at 2 to 4 °C. During storage, some traits such as firmness by manual penetrometer, electrical conductivity of fruit tissue, some components of fruit skin color and soluble solids were assessed by a refrectometer.

Results and discusion: Infrared spectroscopy (FTIR) results confirmed the successful coupling between chitosan amin groups and carboxylic acid-meristic acid groups and scanning electron microscopy image showed that the particle size of chitosan-meric acid nanogel was than 100 nm. The Comparison of the particle size in the present study with the previous studies on the size of chitosan-meric acid nanogels was smaller and more uniform. These differences could be related to several reasons, transform the long chitosan chain into smaller fragments by initial sonication, the important role of ultrasound in the reduction of the particle size and passing the nanogels through the filter. Release test showed that the diffusion of thyme essential oil from chitosan-meric acid nanogels has a two-step process. The chitosan-meric acid nanogels prepared in this study have hydrophilic (chitosan polymer) and hydrophilic (meristic acid fatty acid chain) regions, which led to the gradual release of thyme essential oil due to their hydrophobic nature. The results of the infected packaged berries confirmed that with increasing concentration of thyme essential oil, the antifungal effect was also increased. Evaluation of the effects of essential oil and nanogels - essential oils on grape berries infected with pathogenic spores showed the highest number of spores in control treatment (10.125×10^5 per ml) and the lowest number in NE2 (1.375×10^5 per ml) were observed. Coating treatments of chitosan-meric acid nanogel and thyme essential oil encapsulated in chitosan-meric acid nanogels showed better results at higher concentrations, but in the case of essential oil, lower spores were observed. The lowest electrical conductivity and discoloration, the highest L * component and chroma index were observed in thyme essential oil treatment with concentration of 75 µl/l. The results showed that the lower concentrations of the essential oil in the control of *botrytis cinerea* was better than the pure essential oils, whereas in the experiments on the storage of grape fruit, the treatment of thyme essential oil with a concentration of 75 µl/l It showed the most favorable result. Based on the results of the present study, the effect of essential oil nano-gel and essential oil alone on the shelf life after harvesting of grapes packed with polyethylene film confirmed that the essential oil performance was better than the essential oil nanogel. The lower performance of the essential oil nanogel than that of the essential oil alone can be due to inhibition of the essential oil diffusion through the packaging film while, the encapsulated essential oil release slower than the essential oil alone, it is likely to have an effect longer than expected in this study for the storage period of the grape. Considering this case and the antimicrobial

(*- Corresponding Author Email: hbodaghi@shahroodut.ac.ir)

capability of essential oil nanogel, it is necessary to investigate the effect of essential oil nanogel compared to essential oil on longevity of grapes for a longer of storage period.

Key words: Nanoencapsulation; unti-fungal; Thyme essential oil; *Botrytis cinerea;* grape